

4

BREVET D'INVENTION

FR 00/1937

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JUIL 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

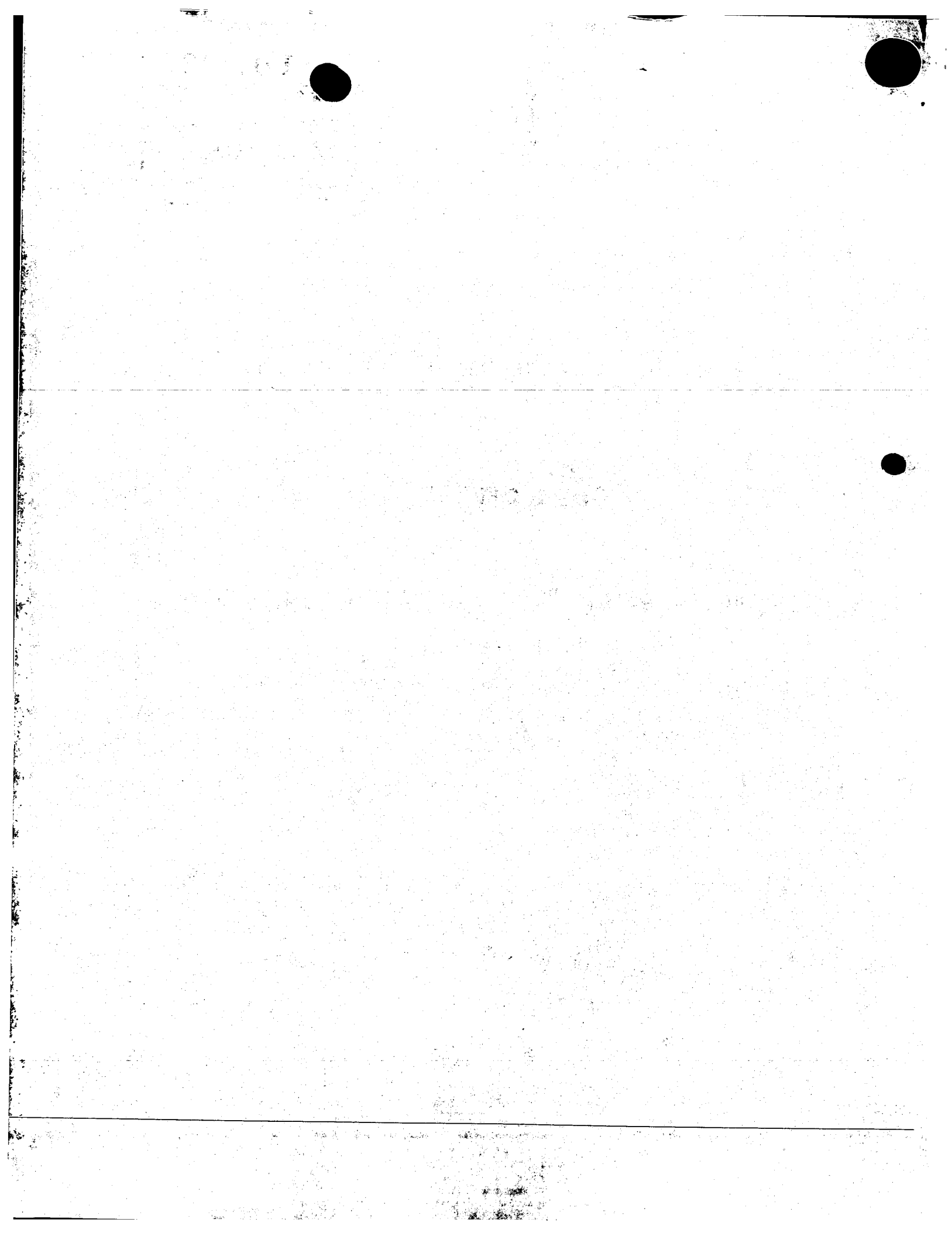
**DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

Reserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **8 JUIL 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9908831**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **08 JUIL. 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Hoechst Marion Roussel
Monsieur VIEILLEFOSSE Jean Claude
102, Route de Noisy
93235 ROMAINVILLE CEDEX

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent **PG 06335** références du correspondant **ML/2520** téléphone **0149915727**

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de purification de facteur de stimulation de colonies de granulocytes.

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN **5 5 2 0 8 1 4 7 3**

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Hoechst Marion Roussel

Forme juridique

**Société Anonyme à
Directoire et Conseil
de Surveillance**

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)

**1, Terrasse Bellini
92800 PUTEAUX**

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
(nom et qualité du signataire)

Jean Claude VIEILLEFOSSE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Division Administrative des Brevet

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national 99 08831

Cas 2520

Titre de l'invention : Procédé de purification de facteur de stimulation de colonies de granulocytes.

Le (s) soussigné (s) Jean Claude VIEILLEFOSSE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

. DUMAS Jacques

10, rue de la Pelouse
F 93360 NEUILLY PLAISANCE

. REY Lucien

34, Avenue de la République
F 94700 MAISONS ALFORT

. SARUBBI Edoardo

16 bis, rue de Neuilly
F 94120 FONTENAY SOUS BOIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Romainville, le 25 novembre 1999


Jean Claude VIEILLEFOSSE

Procédé de purification de facteur de stimulation
de colonies de granulocytes.

La présente invention concerne un procédé de purification d'un facteur de stimulation de colonies de granulocytes (noté G-CSF pour "Granulocyte Colony Stimulating Factor") par chromatographie utilisant un stade de chromatographie sur hydroxyapatite.

Parmi les facteurs de stimulation de colonies qui régulent la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques de mammifères, les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes ont été décrits par exemple dans la demande de brevet internationale WO 87/01132 ou la demande de brevet européenne EP169566.

La préparation de G-CSFs de différentes origines et leur purification ont été décrites dans de nombreuses publications scientifiques ou demandes de brevet. Par exemple, la demande de brevet européenne EP 243153 a décrit un procédé de purification de G-CSF humain à partir de lignées de cellules de carcinome de vessie HBT5637 ; la demande de brevet européenne EP215126 a décrit la purification de G-CSF humain recombinant produit dans *E. coli*. Les procédés décrits ci-dessus correspondent à de multiples stades de purification dans lesquels la concentration initiale des préparations biologiques de départ est généralement obtenue par les méthodes classiques d'ultrafiltration ou de précipitation par un sel, suivies de chromatographies liquides en phase inverse (noté RP-HPLC) successives qui ont l'inconvénient connu de conduire à des pertes de rendement importantes, par exemple parce que la protéine est dénaturée par les solvants organiques. Par ailleurs, le brevet américain US 5,055,555 a décrit un procédé sélectif et simplifié de purification de G-CSF recombinant humain produit dans une levure à plus grande échelle, par précipitation par NaCl précédée d'une concentration par chromatographie sur une colonne d'échangeur de cations (S Sepharose® ou Mono S®), mais dont le rendement et la pureté obtenus ne sont pas mentionnés.

De plus, quelques utilisations de stades de chromatographie, autre que la RP-HPLC, ont été aussi décrites

pour la purification de G-CSFs :

L'utilisation de Phenyl Sepharose® CL-6B (Pharmacia) a été décrite par N A. Nicola et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, p. 9017-9023, 1983 pour la purification
 5 de G-CSF produit naturellement par des cellules leucémiques murines. Après concentration préliminaire du milieu sur fibre creuse et chromatographie "salting out", le G-CSF a été directement fixé sur la colonne de Phenyl Sepharose®, puis élué en utilisant un gradient décroissant de sel, puis un
 10 gradient linéaire d'éthylène glycol.

L'utilisation d'hydroxyapatite a été décrite par T. Arakawa et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 316, p. 285-289, 1995 comme dernier stade de purification de G-CSF produit à partir de cellules CHO transformées.

15 L'utilisation de SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) a été décrite par S-H Kang et al., Biotechnology Letters, Vol. 17, p. 687-692, 1995 pour la purification de G-CSF produit à partir de cellules d'E. coli transformées. Après solubilisation des corps d'inclusion et renaturation, le G-CSF a été
 20 élué en utilisant un gradient de NaCl variant de 0 à 0,5 M.

L'un des objets de la présente invention est de fournir un procédé qui permet d'isoler et de purifier des G-CSFs, à une grande échelle et avec des rendements élevés, par un stade de chromatographie sur hydroxyapatite à partir
 25 d'échantillons biologiques préalablement concentrés et enrichis en utilisant une chromatographie par interaction hydrophobe.

Le procédé de l'invention peut être utilisé par exemple comme premier stade de purification d'un G-CSF dans un
 30 procédé multistade de préparation d'un G-CSF ayant une pureté permettant une utilisation clinique.

L'invention a pour objet un procédé de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de

- 35 a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
 b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des
-

conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et

c) recueillir le G-CSF.

- 5 Le procédé ci-dessus permet de purifier le G-CSF dans des conditions non dénaturantes et d'isoler le G-CSF biologiquement actif.

Le G-CSF purifié selon le procédé de l'invention peut être tout G-CSF connu ayant un intérêt biologique et pharmaceutique. Par G-CSF, on inclut un G-CSF produit
10 constitutivement par des cellules, par exemple par des lignées cellulaires établies à partir de cellules tumorales tel que décrit par Watson et al., J. Immunol., Vol. 137, p. 854-857, 1986, un G-CSF produit par activation du gène du
15 G-CSF (noté GA-GCSF pour "Gene Activation-GCSF) dans des cellules humaines tel que décrit dans la demande de brevet internationale WO 95/31560 ou un G-CSF produit par la technologie de l'ADN recombinant par des cellules hôtes. Les cellules hôtes peuvent être des cellules eucaryotes telles
20 que des cellules de mammifères, par exemple des cellules COS de singe, des cellules CHO de hamster ou des cellules C127 de souris ou telles que des levures, par exemple *S. cerevisiae* ou des cellules procaryotes, par exemple *E. coli*. Des exemples de G-CSF recombinants ont été décrits, par exemple
25 dans la demande de brevet européenne EP217404 qui décrit un G-CSF produit dans des cellules C127 ou dans des cellules CHO, dans le brevet US 5,055,555 qui décrit un G-CSF produit par *S. cerevisiae* ou dans la demande de brevet internationale WO 87/01132 qui décrit un G-CSF produit dans les cellules COS
30 ainsi qu'un G-CSF produit dans *E. coli*. Le procédé permet de purifier aussi bien des G-CSFs glycosylés ou non glycosylés.

L'échantillon biologique à partir duquel le procédé de l'invention permet de purifier un G-CSF comprend les fluides biologiques de cultures cellulaires tels que des lysats de
35 cellules, des corps d'inclusion ou des surnageants de cultures lorsque le G-CSF est excrété. L'échantillon biologique utilisé pour la purification du G-CSF a été de préférence préalablement séparé des cellules ou des débris

cellulaires par les méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par filtration, par centrifugation ou par ultrafiltration.

Par chromatographie par interaction hydrophobe, on entend une chromatographie sur un support de séparation de substances sur la base de leurs différences d'interaction avec des groupes hydrophobes attachés sur une matrice sans groupes ioniques. Le groupe hydrophobe peut-être un ligand aliphatique, par exemple un groupe butyle ou octyle ou un ligand aromatique, par exemple un groupe phényle ou un groupe phénylbutylamine et la matrice est en général un gel, par exemple de l'agarose tel que Sepharose®. Les supports utilisés sont des produits commercialisés. Dans tous les procédés d'utilisation de la chromatographie par interaction hydrophobe, la fixation des protéines au gel hydrophobe est réalisée en présence de hautes concentrations en sels. De façon tout à fait inattendue et avantageuse, le procédé de l'invention comprend une chromatographie par interaction hydrophobe caractérisée par une fixation de la protéine à faible conductivité ou à faible teneur en sel, par exemple le sulfate d'ammonium ou du NaCl, et permet de réduire le volume de l'échantillon biologique initial tout en éliminant les sels ainsi qu'un pourcentage élevé des protéines contaminantes. Le procédé de l'invention permet donc d'obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie en G-CSF non dénaturé qui est ensuite passée sur hydroxyapatite.

Contrairement à l'utilisation de l'hydroxyapatite comme stade final de purification décrite par T. Arakawa et al., 1995 ci-dessus, dans lequel le G-CSF est recueilli dans la fraction non fixée sur de l'hydroxyapatite équilibrée dans un tampon phosphate 10 mM contenant NaCl 0,1 M à pH 7,0, le procédé de l'invention utilise des conditions où le G-CSF est faiblement lié à l'hydroxyapatite et permet ainsi de recueillir une solution concentrée et dessalée de G-CSF purifié.

L'invention a particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le G-CSF recueilli a une pureté d'au moins 90 %.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel l'échantillon biologique est un surnageant de culture cellulaire ainsi que le procédé dans lequel le G-CSF est un G-CSF humain (noté hG-CSF).

5 L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le stade de réduction de volume comprend la mise en contact de l'échantillon biologique sur un support de chromatographie par interaction hydrophobe de type phényle dans des conditions permettant la fixation du
10 G-CSF, puis son élution.

L'invention a plus particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le support de type phényl est un Phenyl Sepharose®.

L'invention a spécialement pour objet le procédé ci-
15 dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon ayant une force ionique comprise entre 0 et 60 mSi et l'élution est effectuée par diminution de la force ionique ou de la concentration en sel dans le tampon de fixation.

20 L'invention a aussi spécialement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 1 M.

L'invention a plus spécialement pour objet le procédé ci-
25 dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 0,5 M et l'élution est effectuée par de l'eau.

Des exemples d'utilisation de la chromatographie par
30 interaction hydrophobe sur Phenyl Sepharose® illustrant le procédé de l'invention sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé de l'invention ci-dessus dans lequel le stade de
35 passage sur hydroxyapatite est effectué dans un tampon de force ionique comprise entre 2 et 30 mSi et à un pH compris entre 5,5 et 7,5.

L'invention a plus particulièrement pour objet le

procédé ci-dessus dans lequel le tampon comprend du phosphate à une concentration comprise entre 1 et 10 mM.

L'invention a aussi plus particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le tampon est un tampon
 5 phosphate 1 mM et le pH est compris entre 6,0 et 7,5.

Des exemples d'utilisation d'hydroxyapatite à la suite d'une chromatographie sur Phenyl Sepharose® illustrant le procédé de l'invention sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

10 L'invention concerne aussi un procédé de purification de G-CSF pouvant être inclus dans un procédé multistade de purification du G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de

- a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant
 15 le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
- b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF
 20 et
- c) recueillir le G-CSF.

L'invention concerne particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel le procédé multistade comprend en outre un ou plusieurs stades de chromatographie choisis parmi le
 25 groupe constitué de chromatographie d'échange d'ions, de gel filtration, de phase inverse ou d'affinité.

Des exemples de stades de chromatographie d'échange d'ions et de gel filtration illustrant l'utilisation du procédé de l'invention dans un procédé multistade de
 30 purification de G-CSF sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention concerne aussi un procédé pour éliminer des protéines contaminantes à partir d'une solution contenant du G-CSF et des protéines contaminantes comprenant :

- 35 a) le passage de la solution sur hydroxyapatite par lequel les protéines contaminantes sont fixées à l'hydroxyapatite et le G-CSF est faiblement lié et
- b) l'élution du G-CSF.

L'invention concerne particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel l'élution du G-CSF est effectuée par simple lavage avec le tampon de fixation.

Les protéines contaminantes présentes dans les solutions contenant du G-CSF ont été par exemple ajoutées dans les milieux de culture cellulaire. Les protéines ajoutées peuvent être par exemple du sérum, tel que du sérum de boeuf ou du sérum foetal de veau, par exemple des protéines de sérum partiellement purifiées, telles que de l'albumine ou de la transferrine ou des mélanges de celles-ci.

Le procédé de l'invention permet d'éliminer ces protéines contaminantes par un passage de la solution contenant du G-CSF sur hydroxyapatite au cours duquel les protéines indésirables sont fortement fixées sur le support et retenues pendant l'élution du G-CSF.

L'invention concerne aussi particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel la solution contenant le G-CSF est préparée par chromatographie par interaction hydrophobe d'un échantillon biologique contenant du G-CSF.

De préférence, la chromatographie par interaction hydrophobe est réalisée sur un support de type phényle, par exemple sur Phenyl Sepharose® comme cela est illustré plus loin dans la partie expérimentale. Le procédé de l'invention permet de façon avantageuse d'éliminer ces protéines contaminantes au cours du premier stade de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique.

Méthodes analytiques

1. Dosage de G-CSF par HPLC

Les fractions recueillies après chromatographie ont été analysées par RP-HPLC analytique sur une colonne Vydac C4 (0,46 x 15), 300Å, 5 microns, équilibrée dans H₂O/TFA 0,1 %, au débit de 2 ml/mn avec un gradient linéaire d'acétonitrile/TFA 0,1 % variant de 40 à 80 % sur 10 minutes, et une détection spectrophotométrique à 214 nm.

Le G-CSF est élué à une concentration d'environ 65 % d'acétonitrile. La concentration en G-CSF est mesurée par rapport à un standard de G-CSF. Une évaluation de la pureté est mesurée par le rapport de la surface du pic de G-CSF à la

surface de l'ensemble des pics autres que le pic d'injection.

2. Dosage de G-CSF par ELISA

La concentration en G-CSF est mesurée en utilisant la trousse ELISA de R&D System Inc et le protocole recommandé par le fournisseur.

3. SDS-PAGE

Les échantillons sont analysés sur des gels de polyacrylamide prêts à l'emploi (Novex) contenant un gradient de 10 à 20 % de polyacrylamide et une coloration à l'argent en utilisant la trousse Silver staining de Biorad pour un dépôt de 50 ng à 1 µg de G-CSF.

Les figures ci-annexées illustrent certains aspects de l'invention.

La figure 1 est un chromatogramme montrant le fractionnement sur phényl Sepharose d'un surnageant de cellules exprimant GA-GCSF et contenant NaCl 0,1 M. Les unités arbitraires représentent respectivement la conductivité et la densité optique (DO) de l'effluent de la colonne exprimées en pourcentage.

La figure 2 est un chromatogramme montrant le fractionnement sur phényl Sepharose d'un surnageant de cellules exprimant GA-GCSF et contenant NaCl 0,5 M. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 3 est un chromatogramme montrant le fractionnement de GA-GCSF sur hydroxyapatite MacroPrep® ceramic Type I après phényl Sepharose. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 4 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de GA-GCSF après phényl Sepharose et hydroxyapatite Type I.

La figure 5 est un chromatogramme montrant le fractionnement de GA-GCSF sur hydroxyapatite MacroPrep® ceramic Type II après phényl Sepharose. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 6 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de GA-GCSF après phényl Sepharose et hydroxyapatite Type II.

La figure 7 représente l'analyse par SDS-PAGE de la purification de GA-GCSF successivement dans un surnageant de culture filtré (puits 3), un éluat de phényl Sepharose (puits

4), un éluat d'hydroxyapatite (puits 5), un éluat de SP Sepharose (puits 6), un concentrat UF (puits 7), un éluat de gel filtration en tampon PBS (puits 9), un éluat de gel filtration en tampon acétate pH 5,5 (puits 11) avec des marqueurs standards de poids moléculaires (puits 1). La bande correspondant au PM apparent du GA-GCSF est indiquée par une flèche.

Exemple 1 : Concentration d'un échantillon biologique de G-CSF par chromatographie sur phényl Sepharose.

10 Le matériel de départ est le surnageant de centrifugation d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF humain obtenu selon la demande de brevet internationale WO95/31560 dans un bioréacteur à fibres creuses Endotronics® dans le milieu DMEM/F12 (Hyclone) contenant 0,9 % de sérum foetal de veau. Après
15 centrifugation, le surnageant a été conservé à -20°C avant utilisation.

Le surnageant décongelé a été chromatographié sur phényl Sepharose après addition de NaCl q.s.p. 0,1 M et filtration
20 sur une membrane Millipore de 0,22 µm, à une température d'environ 15 à 20°C.

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 (1,6 cm x 40 cm) garnie de 50 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution (Pharmacia), conservée sous éthanol à 25 %, puis lavée à l'eau déminéralisée Milli-Q avant utilisation, puis équilibrée par une solution de NaCl 0,1M, la
25 concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

2295 ml de surnageant salé et filtré obtenu ci-dessus
30 (conductivité 17,7 mS.cm⁻¹) sont appliqués sur la colonne au débit de 13 ml/mn en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 500 ml. La colonne est ensuite lavée au débit de 4 ml/mn avec 220 ml de solution NaCl 0,05 M en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 40 ml. La colonne
35 est ensuite éluée au même débit avec 150 ml d'eau déminéralisée Milli-Q en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 2 ml. La colonne est enfin régénérée par un lavage au même débit avec une solution d'urée 8 M.

Les protéines totales dans l'effluent de la colonne sont détectées par absorption à 280 nm et la concentration en sel est suivie à l'aide d'un conductimètre. La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par l'eau, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le lavage à l'urée est montrée à la figure 1.

Les fractions recueillies pendant l'élution à l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA en utilisant les conditions décrites précédemment. Les fractions contenant le G-CSF réunies (40 ml) contiennent 29,3 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 56 % et une pureté de 58 %.

La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de $0,161 \text{ mS.cm}^{-1}$.

Exemple 2 : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF.

Le matériel de départ est le surnageant d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF humain obtenu comme à l'exemple 1 mais en utilisant un bioréacteur de 5 litres au lieu d'un bioréacteur Endotronics®. Le surnageant décongelé a été chromatographié sur phényl Sepharose après addition de NaCl qsp 0,5 M et filtration sur une membrane Millipore $0,45 \mu\text{m}$.

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 garnie de 50 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution (Pharmacia) conservée sous éthanol à 25 %, puis lavée à l'eau déminéralisée Milli-Q avant utilisation, la concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

1640 ml de surnageant salé et filtré obtenu ci-dessus (conductivité $56,3 \text{ mS.cm}^{-1}$) sont appliqués sur la colonne au débit de 4 ml/mn et l'effluent de la colonne est recueilli en fractions de 400 ml. La colonne est ensuite éluée au même débit de 4 ml/mn avec 240 ml de NaCl 0,5M en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 40 ml. La colonne est ensuite éluée au même débit avec 150 ml d'eau déminéralisée Milli-Q en recueillant l'effluent de la colonne

en fractions de 2 ml. La colonne est enfin régénérée par un lavage au même débit avec une solution d'urée 8M.

Les protéines totales dans l'effluent de colonne et la concentration en sel sont détectées comme à l'exemple 1. La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par le lavage à l'eau, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le lavage à l'urée est montrée à la figure 2.

Les fractions recueillies pendant l'élution à l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions contenant le G-CSF réunies (50 ml) contiennent 45,1 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 90 % avec une pureté de 61 %.

La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de 4,22 mS.cm⁻¹ qui permet de l'utiliser telle quelle dans le stade suivant de chromatographie sur hydroxyapatite.

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 garnie de 29 g d'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic, Type I (Bio-rad), préalablement mise en suspension dans le tampon phosphate de sodium 250 mM à pH 7,3 (tampon 250 mM, pH 7,3), puis équilibrée par percolation au débit de 5 ml/mn de 500 ml du tampon 250 mM dilué au 1/250 (tampon 1 mM, pH 7,3), la chromatographie sur hydroxyapatite a été effectuée de la façon suivante :

24 ml de la solution de phényl Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus, puis conservée une nuit à +2°C, sont appliqués sur la colonne d'hydroxyapatite au même débit. La colonne est ensuite éluée avec 150 ml du tampon 1 mM, pH 7,3, puis régénérée par un lavage avec le tampon 250 mM, pH 7,3 au même débit en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 5ml. Les protéines totales dans l'effluent de la colonne et la concentration en sel sont détectées comme à l'exemple 2.

La présence dans l'effluent de colonne d'un pic de protéine éluée par le tampon 1 mM, pH 7,3, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le tampon 250 mM, pH 7,3 est montrée à la figure 3.

Les fractions recueillies pendant l'élution par le tampon 1 mM, pH 7,3 ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions 25 à 49 réunies (25 ml) contiennent 21,3 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 98,4 % avec une pureté de 97,8 % et donne un pic homogène en HPLC (figure 4).

Exemple 3 : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF. 24 ml de la solution de GA-GCSF de phényl Sepharose obtenue à l'exemple 2 ont été chromatographiés sur une colonne d'hydroxyapatite selon les conditions décrites à l'exemple 2, mais en utilisant l'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic de Type II (Biorad) au lieu de Type I.

La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par le tampon 1 mM, pH 7,3, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le tampon 250 mM, pH 7,3 est montrée à la figure 5. Les fractions recueillies pendant l'élution par le tampon 1 mM, pH 7,3 ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (25 ml) contiennent 21,7 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 100,2 % avec une pureté de 94,5 % et donne un pic homogène en HPLC (figure 6).

Exemple 4 : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF à grande échelle.

Le matériel de départ est un surnageant d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF obtenu selon l'exemple 2 mais en utilisant un bioréacteur de 100 litres et le milieu sans sérum de veau. 10,5 litres de surnageant, préalablement concentré par ultrafiltration puis conservé à -20°C avant utilisation et correspondant à 84 litres de bouillon de départ, ont été chromatographiés sur phényl Sepharose après addition de 0,307 kg de NaCl (qsp 0,5 M), puis filtration sur papier Durieux N°127. L'analyse par SDS-PAGE du surnageant de culture filtré ainsi obtenu est montrée à la figure 7 (puits 3).

En utilisant une colonne Pharmacia XK 50/30 garnie de 500 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution

(Pharmacia) conservé sous éthanol à 25 %, puis équilibrée avec une solution de NaCl 0,5 M avant utilisation, la concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

- 5 Le surnageant concentré salé obtenu ci-dessus (conductivité 40 mS.cm^{-1}) est appliqué sur la colonne au débit de 40 ml/mn. La colonne est ensuite éluée au même débit successivement avec 1,5 litres de NaCl 0,5M, puis avec 1,5 litres d'eau Milli-Q en recueillant l'effluent de la colonne
10 en fractions de 20 ml. Les protéines totales et la concentration en sels sont détectées comme à l'exemple 1.

Les fractions correspondant au pic de protéine éluée par l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions
15 contenant le G-CSF réunies (400 ml) contiennent 357 mg de GA-CSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 67,9 % avec une pureté de 20,6 %. La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de 2 mS.cm^{-1} à 20°C .

La solution de phényl Sepharose a été aussi analysée par
20 SDS-PAGE (figure 7, puits 4). Après stabilisation par addition de Pefabloc (0,2 mg/ml) et de benzamidine (1mM), la solution a été immédiatement utilisée pour le stade suivant de chromatographie sur hydroxyapatite.

En utilisant une colonne Pharmacia XK 50/30 garnie de
25 290 g d'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic, Type II (Bio-Rad) préalablement mise en suspension dans 5 litres de tampon phosphate de sodium 1 mM à pH 6 (tampon 1 mM, pH 6), puis équilibrée par percolation de 1 litre de tampon phosphate de sodium 250 mM à pH 6 (tampon 250 mM, pH 6) au débit de
30 50 ml/mn, puis par percolation de 5 litres du tampon 1 mM, pH 6 (générant ainsi une colonne de 500 ml d'hydroxyapatite), la chromatographie sur hydroxyapatite a été effectuée de la façon suivante :

400 ml de la solution de GA-GCSF de phényl Sepharose
35 stabilisée obtenue ci-dessus sont appliqués sur la colonne d'hydroxyapatite au débit de 50 ml/mn. La colonne est ensuite éluée avec 1,50 litres du tampon 1 mM, pH 6 en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 50 ml. Les protéines

totales ainsi que la conductivité de l'effluent de colonne sont détectées comme indiqué à l'exemple 1.

Les fractions recueillies ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (400 ml)

- 5 contiennent 331 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de chromatographie de 92,5 % avec une pureté supérieure à 90 % estimée par HPLC.

La solution d'hydroxyapatite ainsi obtenue a été aussi analysée par SDS-PAGE (figure 7, puits 5).

- 10 **Exemple 5** : Purification ultérieure de G-CSF après chromatographie sur hydroxyapatite.

L'exemple illustre les stades de purification ultérieure de G-CSF pouvant être utilisés après passage sur hydroxyapatite dans un procédé multistade de purification.

- 15 A partir d'une solution d'hydroxyapatite de GA-GCSF humain obtenue selon le procédé de l'invention, un stade de chromatographie sur un échangeur de cations, puis un stade de chromatographie de gel filtration ont été réalisés de la façon suivante :

- 20 1) chromatographie sur échangeur de cations.

Une colonne Pharmacia XK 26/40 garnie de 170 ml de SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) a été équilibrée par lavage au débit de 13,2 ml/mn avec 1,380 litres d'eau Milli-Q, puis avec 1,380 litres de tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5,3

- 25 (tampon 20 mM, pH 5,3).

390 ml de solution d'hydroxyapatite de GA-GCSF obtenue à l'exemple 4 sont appliqués sur la colonne de SP Sepharose au débit de 13,2 ml/mn. La colonne est ensuite lavée au même débit avec 414 ml de tampon 20 mM, pH 5,3, puis avec 1 litre

- 30 de tampon d'élution correspondant à un gradient de NaCl, variant de 0 à 250 mM dans 5 volumes de colonne (850 ml) du tampon 20 mM, pH 5,3 sur 52 minutes, en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 13,2 ml. Par détection des protéines totales dans l'effluent de la colonne par

- 35 absorption à 280 nm, l'élution d'un pic de protéine est observée. Les fractions recueillies ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (237 ml) contiennent 255

mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 78,8 % et une pureté de 98,7 %.

La solution de SP Sepharose ainsi obtenue a été aussi analysée par SDS-PAGE (figure 7, puits 6).

- 5 2) chromatographie par gel filtration.
220 ml de la solution de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus ont été préalablement concentrés environ 10 fois par ultrafiltration dans une cellule Amicon de 300 ml équipée d'une membrane PLGC (Millipore), à + 4°C et sous une pression
10 d'azote de 2 bars. Le concentrat UF ainsi obtenu (21 ml) contient 253 mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 107,1 %. Le concentrat UF a été aussi analysé par SDS-PAGE (figure 7, puits 7).

- Le concentrat UF a été ensuite soumis à un stade de
15 chromatographie par gel filtration de la façon suivante :
Deux colonnes Pharmacia XK 26/40, chacune garnie de 150 ml de Superdex™ 200 prep grade (Pharmacia) et équilibrée par lavage avec 1,35 litres d'eau Milli-Q au débit de 3,3 ml/mn, ont été montées en série, puis équilibrées avec 2,650 litres de
20 tampon PBS (1X) au même débit. On obtient ainsi 265 ml de Superdex™ 200 prep grade en train de deux colonnes.
10 ml de solution concentrée de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus sont appliqués sur le train de colonnes au débit de 3,3 ml/mn. Les colonnes sont ensuite lavées au même
25 débit avec 300 ml de tampon PBS (1X). Par détection des protéines totales dans l'effluent de la colonne par absorption à 280 nm, l'élution d'un pic de protéine est observée. Les fractions recueillies ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique.
30 Les fractions réunies (42,9 ml) contiennent 85,3 mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 70,7 % et une pureté supérieure à 99 %.

- De la même façon, 10 ml de la solution concentrée de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus sont chromatographiés
35 par gel filtration dans les conditions indiquées ci-dessus, mais en utilisant un tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5,5, Tween® 20 (0,005 %) au lieu du tampon PBS (1X). Les fractions réunies (42,9 ml) contiennent 95,4 mg de GA-GCSF titré par

HPLC correspondant à un rendement de 79,1 % et une pureté supérieure à 99 %.

La figure 7 montre l'analyse par SDS-PAGE de la solution de gel filtration obtenue respectivement dans le tampon PBS 5 (puits 9) et dans le tampon acétate, pH 5,5 (puits 11).

REVENDEICATIONS

- 1) Procédé de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de
 - a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
 - b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et
 - c) recueillir le G-CSF.
- 2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le G-CSF recueilli a une pureté d'au moins 90 %.
- 3) Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'échantillon biologique est un surnageant de culture cellulaire.
- 4) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le G-CSF est un G-CSF humain (h G-CSF).
- 5) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le stade de réduction de volume comprend la mise en contact de l'échantillon biologique sur un support de chromatographie par interaction hydrophobe de type phényle dans des conditions permettant la fixation du G-CSF, puis son élution.
- 6) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support de type phényle est un Phenyl Sepharose®.
- 7) Procédé selon la revendication 6 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon ayant une force ionique comprise entre 0 et 60 mSi et l'élution est effectuée par diminution de la force ionique ou de la concentration en sel dans le tampon de fixation.
- 8) Procédé selon la revendication 6 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 1 M.
- 9) Procédé selon la revendication 8 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 0,5 M et l'élution est effectuée par de l'eau.
- 10) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le stade de passage sur hydroxyapatite est effectué dans un tampon de

force ionique comprise entre 2 et 30 mSi et à un pH compris entre 5,5 et 7,5.

- 11) Procédé selon la revendication 10 dans lequel le tampon comprend du phosphate à une concentration comprise entre 1 et 5 10 mM.
- 12) Procédé selon la revendication 10 dans lequel le tampon est un tampon phosphate 1 mM et le pH est compris entre 6,0 et 7,5.
- 13) Procédé de purification de G-CSF pouvant être inclus 10 dans un procédé multistade de purification du G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de
- a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
 - 15 b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et
 - c) recueillir le G-CSF.
- 20 14) Procédé selon la revendication 13 dans lequel le procédé multistade comprend en outre un ou plusieurs stades de chromatographie choisis parmi le groupe constitué de chromatographie d'échange d'ions, de gel filtration, de phase inverse ou d'affinité.
- 25 15) Procédé pour éliminer des protéines contaminantes à partir d'une solution contenant du G-CSF et des protéines contaminantes comprenant
- a) le passage de la solution sur hydroxyapatite par lequel les protéines contaminantes sont fixées à l'hydroxyapatite et 30 le G-CSF est faiblement lié et
 - b) l'élution du G-CSF.
- 16) Procédé selon la revendication 15 dans lequel l'élution du G-CSF est effectuée par simple lavage avec le tampon de fixation.
- 35 17) Procédé selon la revendication 15 dans lequel la solution contenant le G-CSF est préparée par chromatographie par interaction hydrophobe d'un échantillon biologique contenant du G-CSF.
-

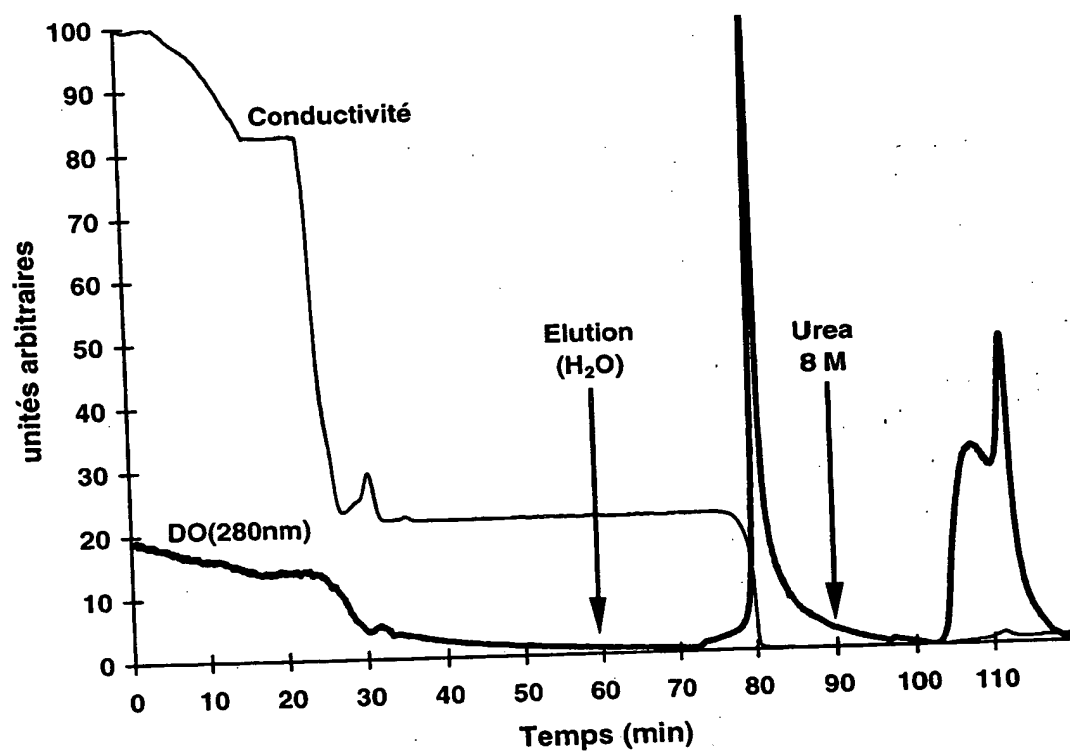
Ph nyl-Sepharose

FIGURE 1

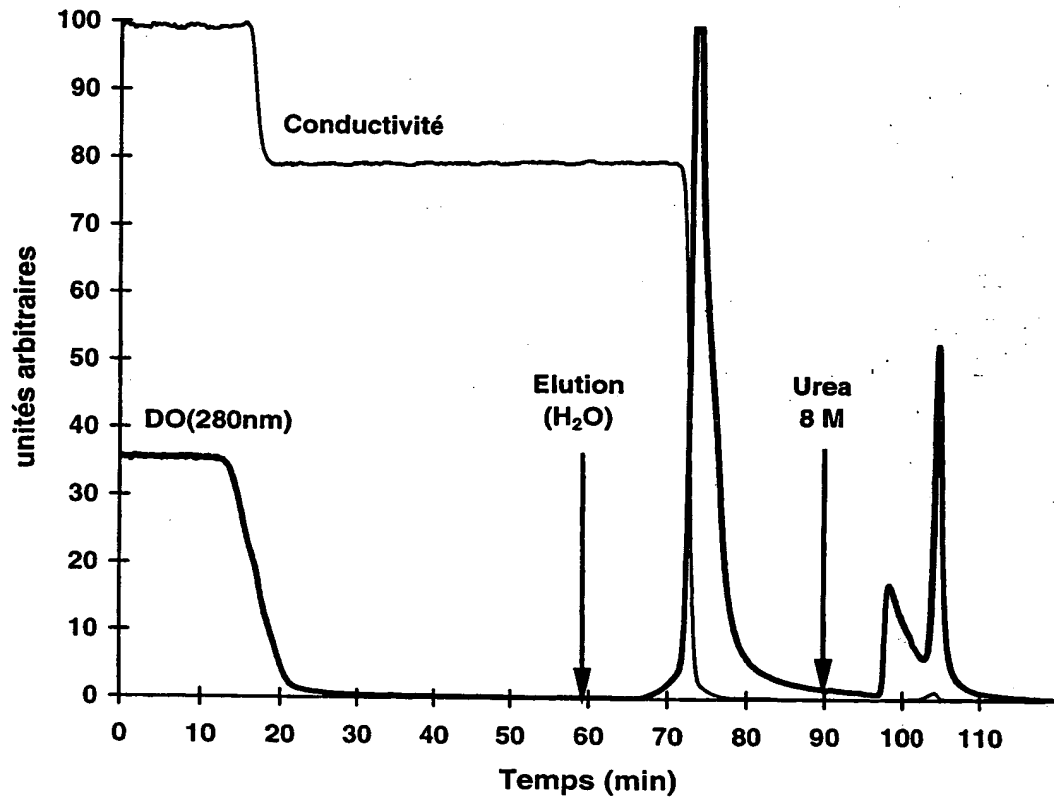
Phenyl-Sepharose

FIGURE 2

Hydroxyapatite

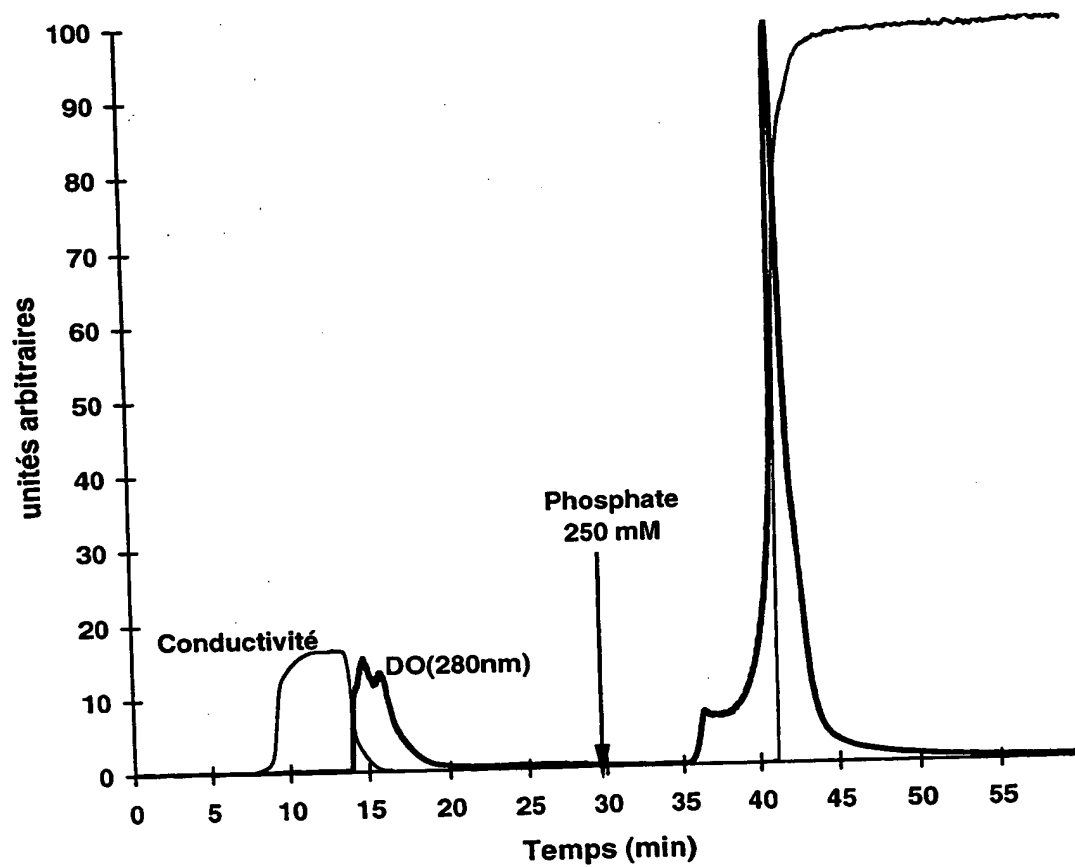


FIGURE 3

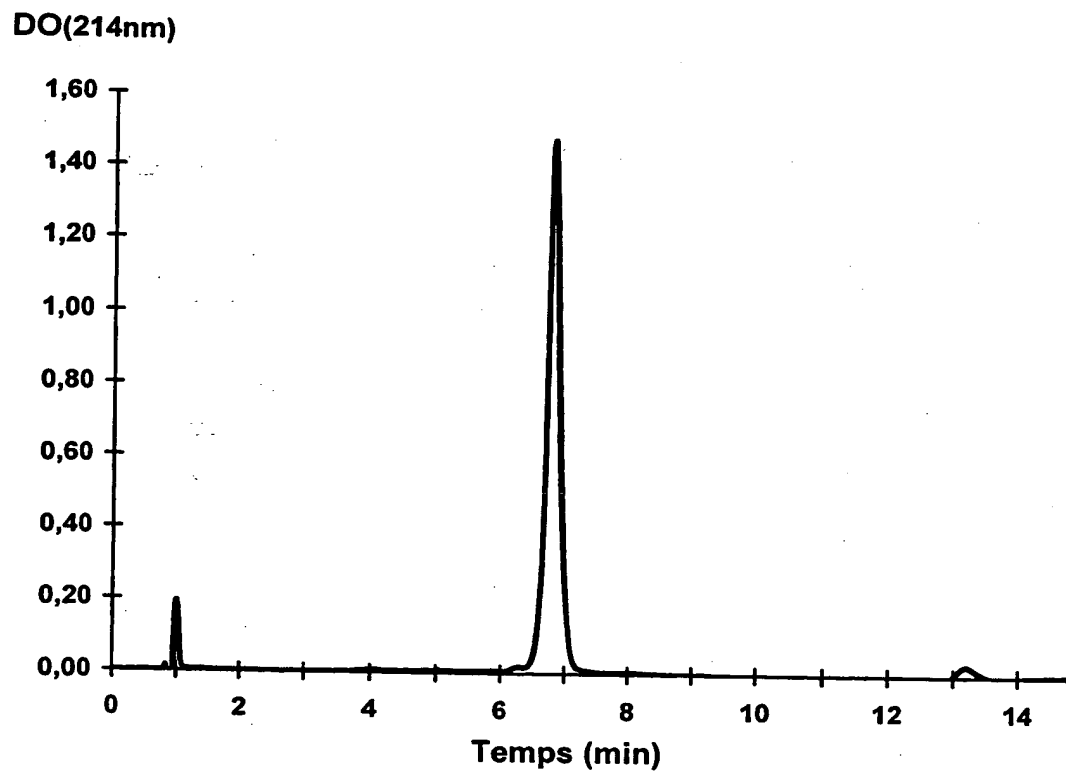


FIGURE 4

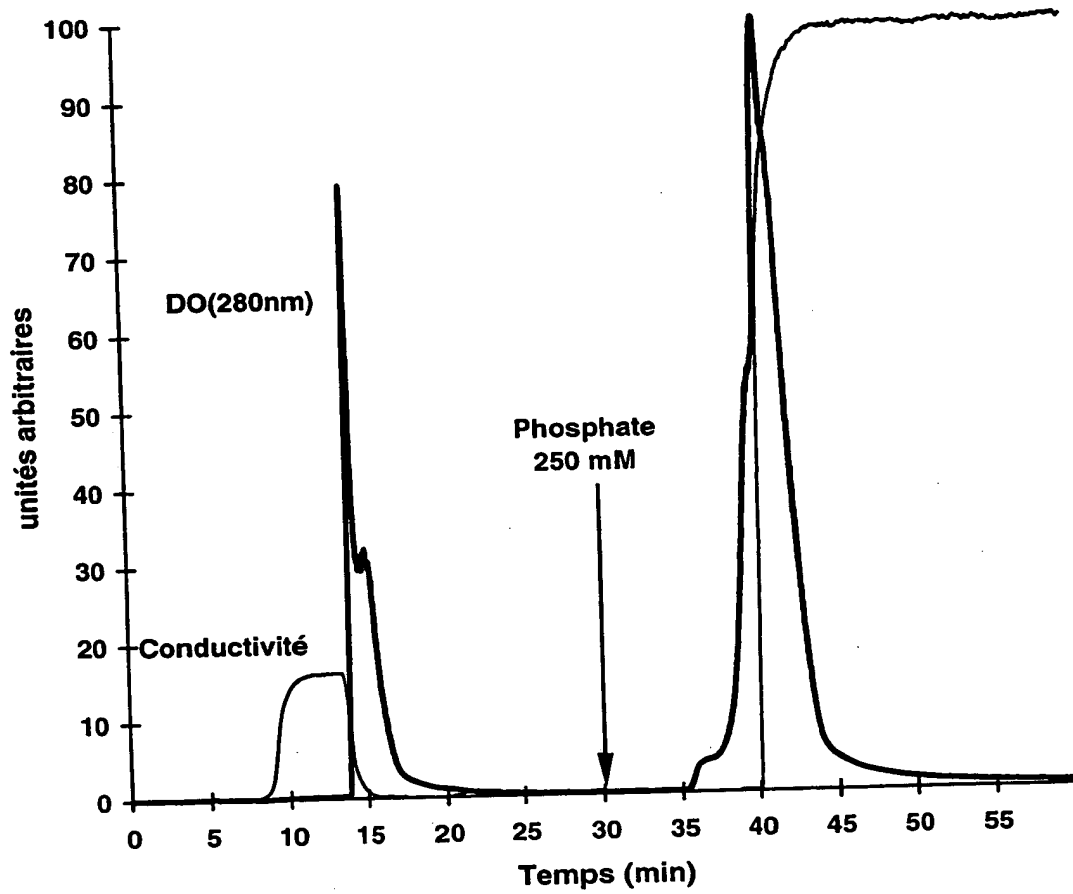
Hydroxyapatit

FIGURE 5

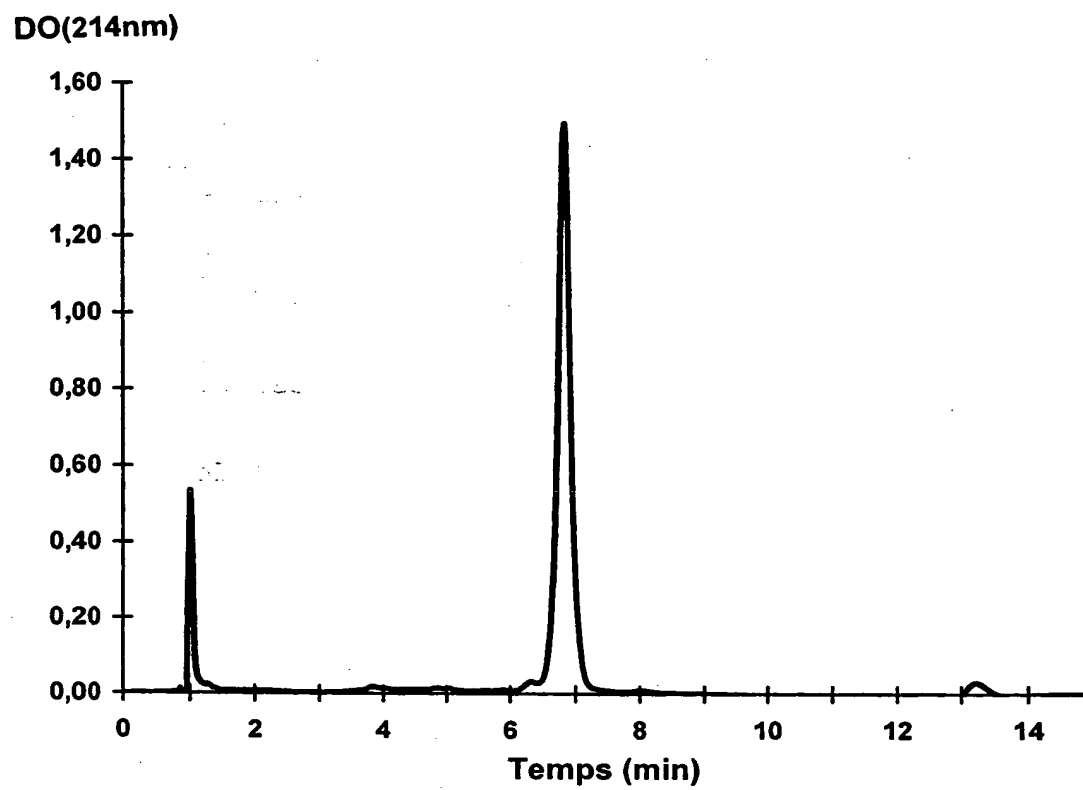


FIGURE 6

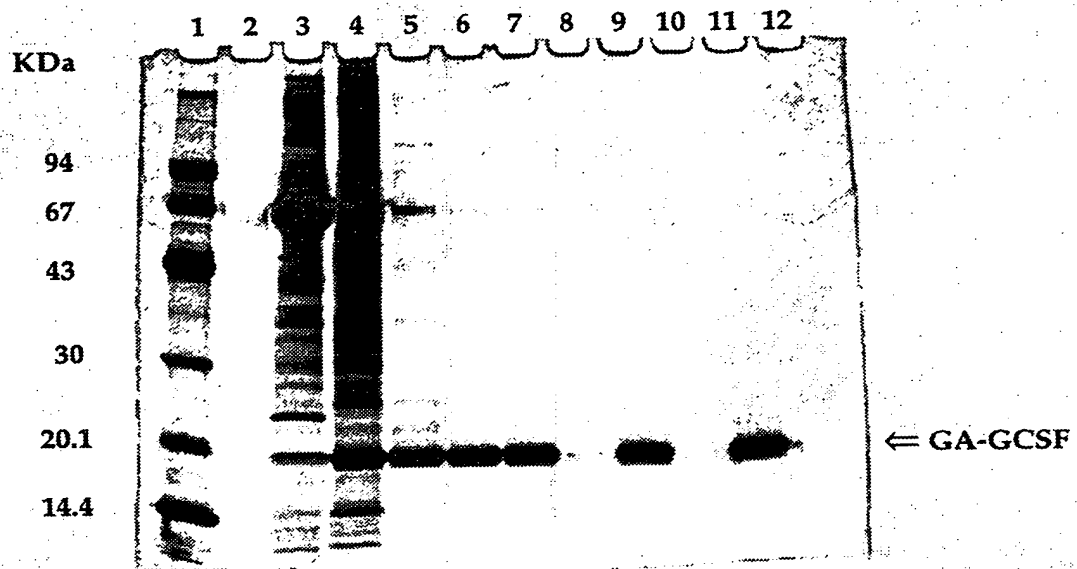


FIGURE 7

